

نقش همزیستی میکوریزی در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از فلز سنگین منگنز در گیاه پسته

فرشته محمدحسینی جور^{۱*} و علی احمدی مقدم^۲

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، ^۲ گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۰/۰۱)

چکیده

به منظور بررسی نقش همزیستی اکتومیکوریزی گیاه پسته رقم فندق با قارچ *Agaricus bisporus* در مقاومت به غلظت‌های متفاوت از فلز منگنز، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج سطح فلز منگنز (صفر، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار) و دو سطح تلقیح و عدم تلقیح با این قارچ، در سه تکرار اجرا گردید و تأثیر این همزیستی بر پاسخ آنتی‌اکسیدانی گیاه، پراکسیداسیون لیپیدی، درصد آغشتگی (درصد میکوریزی شدن) ریشه‌ها و میزان تجمع فلزی در اندام هوایی و ریشه‌های گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج، تحت شرایط تنش فلز سنگین منگنز، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی مشاهده شد. کاهش محتوای آسکوربات و گلوکاتیون و کاهش معنی‌دار درصد آغشتگی ریشه‌ها نیز با افزایش غلظت فلز سنگین مشاهده شد. میزان فلز منگنز منتقل شده از ریشه به بخش هوایی در گیاهان همزیست شده با قارچ کمتر از گیاهان غیرهمزیست بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که قارچ میکوریزی *Agaricus bisporus* به لحاظ بهبود سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان و ممانعت از انتقال فلز سنگین به بخش هوایی، خطرات ناشی از تنش فلزات سنگین بر رشد گیاه پسته را تعدیل می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم آنتی‌اکسیدان، اکتومیکوریز، پسته فندق، منگنز

مقدمه

غلظت‌های بالاتر از حد بهینه سبب القای تنش اکسیداتیو و ایجاد رادیکال‌های فعال اکسیژن شده و از طریق اختلال در ساختار غشاء و آسیب به ماکرومولکول‌های حیاتی گیاه بر رشد گیاه اثر منفی گذاشته و یا حتی منجر به مرگ گیاه می‌شوند (Dalvi and Satish, 2013). از جمله مکانیسم‌های سلولی برای کاهش سمیت فلزی، غیرمتحرک‌سازی یون‌های فلزی از طریق همزیستی میکوریزی و از جمله اکتومیکوریز است (Fernandez et al., 2017). در ارتباط با نقش قارچ اکتومیکوریز در تحمل فلزات سنگین توسط گیاه میزبان، اکثر

امروزه یکی از مسائل زیست‌محیطی آلوده شدن خاک زیرکشت گیاهان مختلف به فلزات سنگین است. در حقیقت فعالیت‌های انسانی مانند توسعه صنایع، ذوب فلزات، استخراج معادن، مصرف کودهای شیمیایی حاوی فلزات سنگین ممکن است منجر به تجمع زیاد فلزات سنگین در خاک شود (هاشمی و اسرار، ۱۳۸۹). اگرچه برخی از این فلزات مانند مس، آهن، منگنز و روی جزء عناصر ریزمغذی ضروری هستند که برای محدوده وسیعی از فرآیندهای سلولی مورد نیاز هستند اما در

مینزیم و فلز سنگین کادمیوم مطالعات محدودی انجام شده است. از این رو در این تحقیق سعی می‌شود تا به اثبات تأثیر مثبت همزیستی اکتومیکوریزی قارچ *Agaricus bisporus* با گیاه پسته در تحمل یکی از تنش‌های رایج در زمین‌های کشاورزی پرداخت تا اثر مثبت این رابطه بر گیاه پسته به خاطر اهمیت این محصول از نظر تغذیه‌ای و اقتصادی بررسی شود که آیا نتیجه این همزیستی مسالمت‌آمیز به نفع گیاه پسته می‌باشد و یا خیر.

مواد و روش‌ها

پس از جمع‌آوری قارچ *Agaricus bisporu* (J. Langes) از زیر درختان پسته در باغی واقع در ایستگاه شماره ۲ مؤسسه تحقیقات پسته کشور واقع در رفسنجان- کرمان، این قارچ در محیط‌کشت ملین - نورکرانس آگار (MMN) شامل: (۰/۵ g) CaCl_2 ، (۰/۰۵ g) NaCl ، (۰/۰۲۵ g) KH_2PO_4 ، (۰/۱۵ g) MgSO_4 ، (۰/۲۵ g) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ، (۱۰۰ mg) کلرید تیامین، (۱/۲ml) $\text{Fe}(\text{Cl}_3)$ ، عصاره مالت (۳ g) و گلوکز (۱۰ g) در شرایطی کاملاً استریل رشد کرد (Marx, 1969).

محیط‌کشت در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد و پس از اضافه کردن ۱۵ گرم آگار و پس از تنظیم pH محلول به میزان ۵/۸، مرحله استریل محلول موردنظر از طریق اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ظرف‌های محیط‌کشت پس از کشت قارچ در شرایط استریل به مدت چهار هفته در دمای معمولی اتاق قرار داده شدند تا قارچ‌ها رشد کند (Laiye et al., 2003). به منظور ایجاد نهال‌های پسته، بذرهای پسته پس از خیس شدن در آب به مدت دو هفته در دمای ۴ درجه قرار گرفتند و در محلول ۰/۵ درصد هیپوکلرید کلسیم و سپس در محلول توئین یک درصد گذاشته و در نهایت چهار بار با آب مقطر استریل شسته شدند تا استریل شوند. این کار دو بار تکرار شد، سپس بذرهای داخل پتری‌دیش استریل در دمای آزمایشگاه در تاریکی قرار داده شدند تا جوانه بزنند. پیت و پرلیت چهار بار با آب شیر شسته و خشک شدند و در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و در دمای

مکانیسم‌های پیشنهاد شده فرایندهای متنوعی از دفع را شامل می‌شوند که حرکت فلزات به ریشه‌های میزبان را محدود می‌کنند (Mohammadi and Khalesro, 2010). نتایج بررسی‌ها نشان داده است که در خاک‌هایی که دارای قارچ اکتومیکوریزی به صورت همزیست با گیاه هستند میزان فلزات سنگین موجود در خاک کمتر از حالتی است که همزیستی اکتومیکوریزی وجود ندارد (نادرنژاد، ۱۳۹۲).

پسته با نام علمی (*Pistacia vera* L.) یکی از گیاهان مهم تیره Anacardiaceae (سماق) است که متعلق به راسته سداب (Sapindales) است و ایران به‌عنوان دومین صادرکننده پسته بعد از آمریکا شناخته شده است (Schramm, 2019). محصول این گیاه از عمده‌ترین محصولات صادراتی غیرنفتی می‌باشد و از جمله درختانی است که رابطه همزیستی آن هم به صورت میکوریز و زیکولار آریوسکولار و هم اکتومیکوریزی گزارش شده است به طوری که این گیاه با گونه‌های مختلفی از قارچ *Glomus* و *Gigaspora* وارد رابطه میکوریزی از نوع زیکولار آریوسکولار می‌گردد و اثرات مثبت این همزیستی در بهبود جذب عناصر معدنی توسط Kafkas و Ortas (۲۰۰۹)، صالحی و همکاران (۱۳۸۷) و افزایش تحمل به تنش شوری توسط فلاحیان و همکاران (۱۳۸۴) به اثبات رسیده است. همچنین اثرات مثبت همزیستی اکتومیکوریزی این گیاه با قارچ *Agaricus bisporus* در جلوگیری از سمیت مینزیم توسط بهرامی سیرمندی و همکاران (۱۳۸۹)، در جلوگیری از سمیت فلز سنگین کادمیوم محبوب القلوب (۱۳۹۰) و در تخفیف اثرات اشعه UV توسط نادرنژاد (۱۳۹۲) گزارش شده است.

کودهای شیمیایی که در زمین‌های کشت پسته استفاده می‌شود دارای مقادیر بالایی از فلزات سنگین می‌باشد و احتمال جذب این فلزات توسط درختان پسته و اثرات سوء آنها بر درخت و بر انسان به‌عنوان مصرف‌کننده مورد تأمل و بررسی است (پناهی، ۱۳۸۷). ایجاد ارتباط و همزیستی میکوریزی از نوع اکتومیکوریز و نقش آن در افزایش تحمل فلز سنگین در بسیاری از گیاهان گزارش شده است اما تا کنون این مورد در گیاه پسته گزارش نشده است و تنها در مورد عنصر غذایی

(MDA) که محصول اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع هستند، اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدهید به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) انجام شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $1 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری برحسب میکرومول بر وزن تر گیاه محاسبه و ارائه گردید.

سنجش مقدار اسید آسکوربیک: برای سنجش مقدار اسید آسکوربیک از روش De Pinto و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. برای اندازه‌گیری مقدار آسکوربیک اسید، $0/5$ گرم بافت تازه وزن شد و در 10 میلی‌لیتر متاسفریک اسید 5% ساییده شد و به مدت 15 دقیقه در 10000 g سانتریفیوژ گردید. سپس به محلول روبی بافر فسفات پتاسیم 100 میلی‌مولار، آلفا-آلفا دی پیریدیل $10/4$ ، 10 میکرولیتر FeCl_3 اضافه شده و بعد شدت جذب را در طول موج 525 نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری مقدار گلوکاتایون احیا (GSH): اندازه‌گیری مقدار گلوکاتایون احیا براساس روش المن (Ellman, 1959) انجام گرفت. براساس این روش $0/5$ گرم بافت تازه برگگی در 4 میلی‌متر متاسفریک 15 درصد سائیده شد و عصاره حاصل به مدت 30 دقیقه در $10000 \times \text{g}$ و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. به 200 میکرولیتر از محلول روبی حاصل از سانتریفیوژ $2/6$ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات و 200 میکرولیتر محلول DTNB 6 میلی‌مولار اضافه گردید و پس از 30 دقیقه جذب نمونه‌ها در 412 نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت گلوکاتایون احیا از منحنی استاندارد آن استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX): فعالیت این آنزیم براساس روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. در این روش مخلوط واکنش حاوی بافر پتاسیم فسفات 50 میلی‌مولار ($\text{pH}=7$)، آسکوربات $0/5$ میلی‌مولار، آب اکسیژنه $0/1$ میلی‌مولار و 150 میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آسکوربات براساس اکسیداسیون آسکوربیک اسید و کاهش در جذب، در طول موج 290 نانومتر به مدت 2 دقیقه اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت آسکوربات اکسیدشده از ضریب

121 درجه و به مدت 20 دقیقه استریل شدند. سه هفته بعد از جوانه‌زنی، گیاهک‌ها در شرایط استریل به ارلن‌های 500 میلی‌لیتری که حاوی پرلیت به مقدار 54 گرم و پیت‌ماس به مقدار $6/5$ گرم بود، وارد شدند و 80 میلی‌لیتر محلول هوگلند با غلظت $1/2$ نیز افزوده شد (Gellier et al., 1984). در کنار ریشه‌های نیمی از ارلن‌ها، قطعات قارچ یک اندازه (10 دیسک) گذاشته شد. هر یک از دو گروه از ارلن‌ها که حاوی گیاهان میکوریزی و یا غیرمیکوریزی بودند به چهار گروه با حداقل سه تکرار تقسیم شدند. بعد از هشت هفته از رشد گیاهک‌ها، به‌منظور تشخیص و اطمینان از اکتومیکوریزی شدن نهال‌ها، از ریشه‌هایی که احتمال وجود اکتومیکوریزی را داشته برش‌های عرضی گرفته و پس از رنگ‌آمیزی با متیلن بلو یک درصد، در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. پس از اطمینان از ایجاد ارتباط میکوریزی بین نهال‌ها و قارچ و پس از بهینه‌سازی غلظت‌های مورد استفاده از فلز منگنز جهت تیمار، گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی به مدت هشت هفته در اتاقک رشد با شرایط کنترل‌شده تحت دوره نوری $16/8$ (تاریکی /نور)، دوره دمایی $28/18$ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) و رطوبت نسبی $60-50$ درصد، تحت تیمار پنج غلظت از فلز منگنز (صفر، 200 ، 400 ، 600 و 800 میکرومولار) با استفاده از نمک سولفات منگنز قرار گرفتند.

درصد میکوریزی ریشه‌ها: بعد از گذشت شش هفته از تلقیح و اطمینان از ایجاد ارتباط میکوریزی، ریشه‌های میکوریزی‌شده در زیر استریوسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند. به این صورت که ریشه‌های میکوریزی روی کاغذ میلی‌متری به صورت تصادفی پخش شدند و نقاط برخورد ریشه با خطوط اصلی کاغذ و نیز تعداد نقاط برخوردی که واجد آغستگی بودند شمارش شدند. پس از آن نسبت این نقاط آغشته به کل نقاط برخوردی برحسب درصد محاسبه گردید و به صورت درصد آغستگی ریشه‌ها به اکتومیکوریزی ذکر شد (Turjaman et al., 2005).

سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها: برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، غلظت مالون دی‌آلدهید

خشک (ریشه و اندام هوایی) در ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ حل و سوسپانسیون اسیدی حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محلول‌ها با آب دیونیزه به حجم رسیده و مقدار جذب آنها با کمک دستگاه جذب اتمی مدل (Varian SpectraAA-220) ساخت ژاپن انجام گرفت. در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد و با استفاده از معادله $y = 8.425x - 3.6188$ غلظت فلز تعیین گردید.

آنالیز آماری: این تحقیق در قالب یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی با پنج سطح فلز منگنز (صفر، ۲۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر) و دو سطح تلقیح و عدم تلقیح با قارچ و در سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پارامترها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.0 تحت آنالیز واریانس یک‌طرفه قرار گرفتند و میانگین داده‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0/05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از تأثیر تیمار منگنز بر غلظت مالون دی‌آلدئید: میزان سنتز مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی در برگ‌های هر دو گروه از گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی از غلظت ۲۰۰ میکرومولار منگنز به بعد نسبت به گیاهان شاهد به‌طور معنی‌دار افزایش یافت که البته این میزان در گیاهان غیرمیکوریزی نسبت به گیاهان میکوریزی بیشتر بود. بیشترین درصد افزایش محتوای مالون دی‌آلدئید در غلظت ۸۰۰ میکرومولار منگنز در رقم فندق غیرمیکوریزی بود که ۵۸/۶۱ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش داشت.

این نتایج حاکی از این است که فلز منگنز موجب القای تنش اکسیداتیو و در نتیجه تولید بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه پسته شده است (شکل ۱ و جدول ۱).

نتایج حاصل از تأثیر تیمار منگنز بر محتوای آسکوربیک اسید و گلوکاتینون احیا: اثر فلز سنگین منگنز بر محتوای آسکوربیک اسید و گلوکاتینون احیا در نمودار (۲ و ۳) نشان داده شده است. در تیمار گیاهان دو رقم پسته میکوریزی و غیرمیکوریزی با فلز منگنز کاهش محتوای آسکوربات با

خاموشی آن معادل $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ و فرمول $A = \epsilon bc$ استفاده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به‌عنوان مقدار آنزیمی است که ۱ میلی‌مول آسکوربیک اسید را در مدت ۱ دقیقه اکسید کند.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش اسپکتروفتومتری SOD: پس از تهیه عصاره آنزیمی مخلوط واکنشی شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، NBT ۰/۰۷۵ میکرومولار، Na-EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۷۵ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. برای سنجش فعالیت این آنزیم علاوه بر شاهد (برای صفرکردن دستگاه اسپکتروفتومتر) نیاز به نمونه کنترل نیز می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه‌ها در مقایسه با کنترل سنجیده می‌شود.

در لوله کنترل نیز مخلوط واکنش ذکر شده وجود داشت با این تفاوت که به آن عصاره آنزیمی اضافه نشد. بنابراین به دلیل عدم وجود آنزیم در کنترل، احیاء NBT در حضور نور (احیاء نوری) به‌طور ۱۰۰٪ در کنترل انجام و تمام نیتروبلو تترازولیوم موجود در مخلوط واکنش در حضور نور به فورمازون تبدیل می‌شود. میزان جذب کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده ۱۰۰٪ احیاء نوری NBT است و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی است. بنابراین یک واحد آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰٪ ممانعت از احیاء نوری احیای نیتروبلو تترازولیوم (یا جلوگیری از تبدیل آن به فورمازون) می‌گردد. اختلاف جذب نمونه‌ها و کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان دهنده مهار احیاء نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه است (Giannopolitis and Raies, 1977). با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه‌ها محاسبه و فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) در ۵۰ میکرولیتر عصاره حاصل از روش Bradford (۱۹۷۶) بیان گردید.

سنجش میزان فلز منگنز در ریشه و اندام هوایی: به‌منظور اندازه‌گیری میزان فلز منگنز در بافت گیاه از روش جذب اتمی Lozak و Soltyk (۲۰۰۲) استفاده شد. ۰/۵ گرم از نمونه گیاهی

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس (مقادیر میانگین مربعات) تأثیر سطوح مختلف فلز منگنز بر محتوای مالون دی آلدئید، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز)، گلوکاتایون و غلظت منگنز در ریشه و اندام هوایی در برگ پسته فندق میکوریزی و غیرمیکوریزی

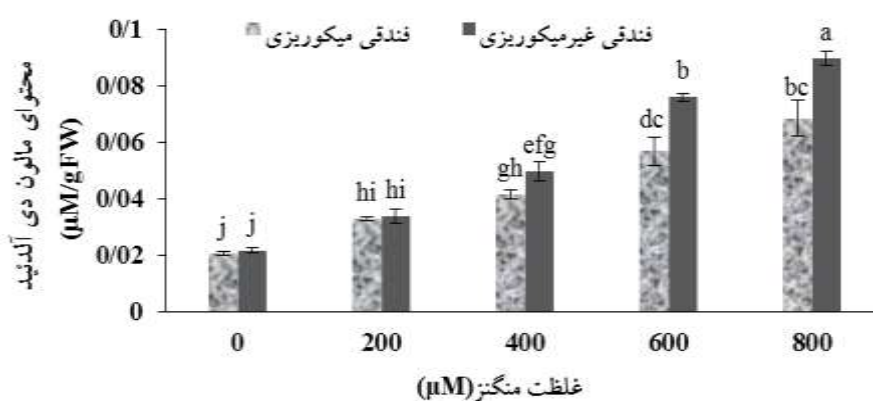
منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای مالون دی آلدئید		درصد میکوریزی
		محتوای گلوکاتایون mg/gFW	محتوای آسکوربات mg/gFW	
منگنز	۴	۰/۱۴۹**	۱/۱**	۱۵۵/۳**
میکوریزی	۱	۰/۰۳۴**	۰/۹۹۶**	۷۵۵۲/۵**
منگنز × میکوریزی	۴	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۶ ^{ns}	۱۵۵/۳**
خطا	۲۰	۰/۰۰۱	۰/۰۱۹	۳/۶
کل	۳۰			

** بیانگر معنی دار بودن در سطح ۰/۰۱، * بیانگر معنی دار بودن در سطح ۰/۰۵، ^{ns} معنی دار نیست.

ادامه جدول ۱-

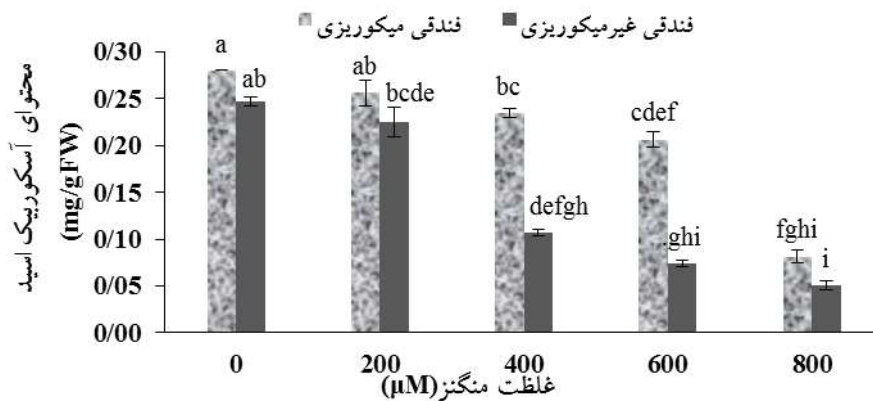
منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای منگنز ریشه		فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز
		محتوای منگنز اندام هوایی mg/gDW	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز U/mg protein	
منگنز	۴	۰/۰۱**	۰/۰۲۳**	۲۰/۱۹**
میکوریزی	۱	۰/۰۰۹**	۰/۰۳۶**	۶/۹۹**
منگنز × میکوریزی	۴	۰/۰۰۳**	۰/۰۰۹**	۰/۵۵**
خطا	۲۰	۰/۰۰۱	۰	۰/۰۹۸
کل	۳۰			

** بیانگر معنی دار بودن در سطح ۰/۰۱، * بیانگر معنی دار بودن در سطح ۰/۰۵، ^{ns} معنی دار نیست.

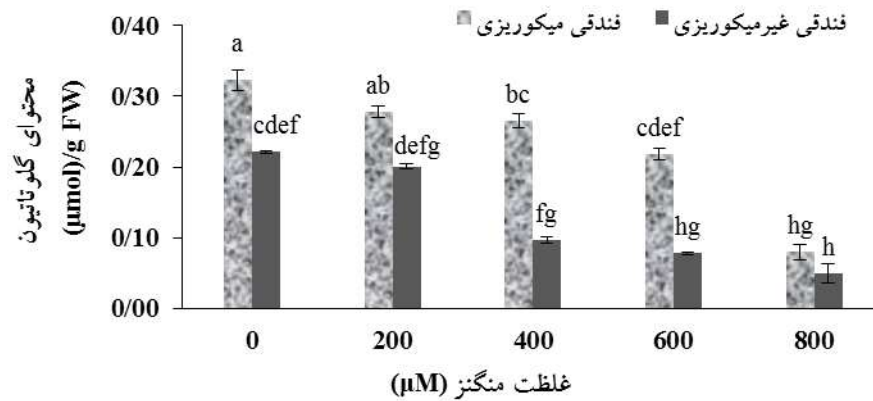


شکل ۱- اثر سطوح مختلف فلز منگنز بر محتوای مالون دی آلدئید در برگ پسته فندق میکوریزی و غیرمیکوریزی. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE است. براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) می‌باشند.

افزایش غلظت منگنز در محلول غذایی گزارش شد که این کاهش از غلظت ۴۰۰ میکرومولار نسبت به گیاهان شاهد



شکل ۲- اثر سطوح مختلف فلز منگنز بر محتوای آسکوربیک اسید در برگ پسته فندقی میکوریزی و غیرمیکوریزی. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE است. براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشند.



شکل ۳- اثر سطوح مختلف فلز منگنز بر محتوای گلو تاتیون احیا در برگ پسته فندقی میکوریزی و غیرمیکوریزی. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE است. براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشند.

نتایج حاصل از اثر منگنز بر فعالیت آنزیم‌های

آنتی‌اکسیداتیو در گیاه پسته: منگنز سبب القای بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو در برگ گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریزی شد. نمودار شکل ۴ (A-B) نشان داد که فعالیت دو آنزیم SOD، APX، به‌ویژه در غلظت‌های بالای تیمار (۶۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار) بین دو گروه گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی افزایش معنی‌داری را نشان داد.

افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار گیاهان با فلز منگنز در مورد پسته میکوریزی از غلظت ۲۰۰ میکرومولار و در ارقام غیرمیکوریزی از غلظت ۴۰۰ میکرومولار نسبت به گیاهان گروه شاهد معنی‌دار بود (شکل ۴A).

معنی‌دار بود (شکل ۲).

در تیمار هر دو گروه از گیاهان پسته میکوریزی و غیرمیکوریزی با فلز منگنز، کاهش محتوای گلو تاتیون با افزایش غلظت منگنز در محلول غذایی گزارش شد که این کاهش در مورد گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی از غلظت ۴۰۰ میکرومولار نسبت به گیاهان گروه شاهد معنی‌دار بود. محتوای گلو تاتیون برگ گیاهان غیرمیکوریزی نسبت به گیاهان میکوریزی کاهش بیشتری داشت که این کاهش معنی‌دار بود. بیشترین میزان کاهش محتوای گلو تاتیون برگ در تیمار گیاهان با فلز منگنز، در غلظت ۸۰۰ میکرومولار منگنز بود که ۷۷/۹۹ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش را نشان داد (شکل ۳، جدول ۲ و ۳).

جدول ۲- جدول مقایسه میانگین‌های تأثیر سطوح مختلف فلز منگنز بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز)، محتوای مالون دی‌آلدئید، گلوکاتیون و غلظت منگنز در ریشه و اندام هوایی در برگ پسته فندقی میکوریزی

تیمار منگنز	محتوای منگنز ریشه	محتوای منگنز اندام هوایی	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز
	mg/gDW	mg/gDW	U/mg protein	U/mg protein
شاهد	۰/۰۸۳۷ ^g	۰/۰۶۰۰ ^m	۰/۴۱۸۳ ^g	۰/۶۸۸۲ ^{hg}
۲۰۰ میکرومولار	۰/۰۹۹۷ ^{fgh}	۰/۰۸۳۰ ^{lm}	۰/۷۰۶۷ ^{fg}	۱/۷۸۷۷ ^{ef}
۴۰۰ میکرومولار	۰/۱۱۰۷ ^{efgh}	۰/۰۸۸۳ ^{klm}	۱/۴۱۹۳ ^f	۲/۲۶۰۶ ^d
۶۰۰ میکرومولار	۰/۱۱۹۰ ^{defgh}	۰/۱۰۹۷ ^{ijkl}	۶/۱۵۹۰ ^b	۳/۷۷۲۸ ^c
۸۰۰ میکرومولار	۰/۲۳۹۷ ^b	۰/۱۲۶۳ ^{ij}	۸/۶۵۰۰ ^a	۶/۱۰۱۹ ^a

حروف مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف غیرمعنی دار تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. داده‌ها، میانگین سه تکرار \pm SE است.

ادامه جدول ۲-

تیمار منگنز	محتوای مالون دی‌آلدئید	محتوای گلوکاتیون	محتوای آسکوربات	درصد میکوریزی
	μ M/gFW	mg/gFW	mg/gFW	
شاهد	۰/۰۲۰۶ ^j	۰/۳۲۳۱ ^a	۰/۲۸۰۰ ^a	۴۵ ^a
۲۰۰ میکرومولار	۰/۰۳۲۸ ^{hi}	۰/۲۷۸۰ ^{ab}	۰/۲۵۶۱ ^{ab}	۳۷/۶۶۷ ^{bc}
۴۰۰ میکرومولار	۰/۰۴۱۴ ^{gh}	۰/۲۶۴۹ ^{bc}	۰/۲۳۴۷ ^{bc}	۳۱/۶۶۴ ^{cd}
۶۰۰ میکرومولار	۰/۰۵۶۸ ^{dc}	۰/۲۱۸۴ ^{cdef}	۰/۲۰۶۴ ^{cdef}	۲۵/۳۳۳ ^{fg}
۸۰۰ میکرومولار	۰/۰۶۸۳ ^{bc}	۰/۰۷۹۹ ^{hg}	۰/۸۱۵ ^{fghi}	۱۹ ^h

حروف مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف غیرمعنی دار تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. داده‌ها، میانگین سه تکرار \pm SE است.

جدول ۳- جدول مقایسه میانگین‌های تأثیر سطوح مختلف فلز منگنز بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز)، محتوای مالون دی‌آلدئید، گلوکاتیون و غلظت منگنز در ریشه و اندام هوایی در برگ پسته فندقی غیرمیکوریزی

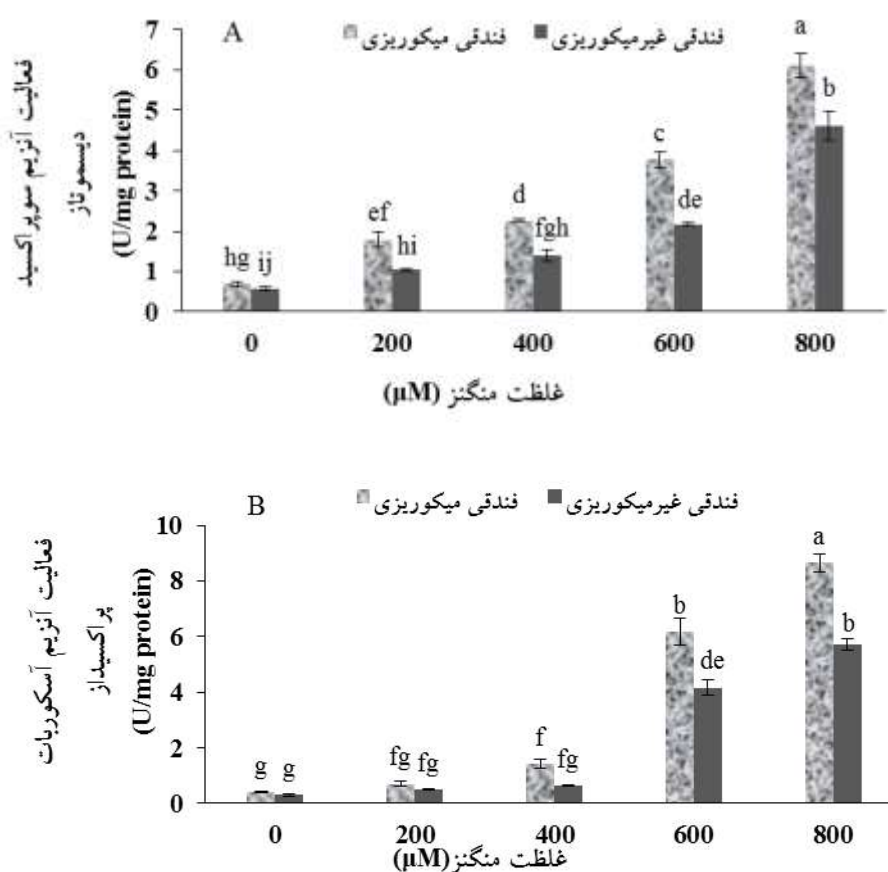
تیمار منگنز	محتوای منگنز ریشه	محتوای منگنز اندام هوایی	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز
	mg/gDW	mg/gDW	U/mg protein	U/mg protein
شاهد	۰/۰۶۸۷ ^g	۰/۰۸۵۰ ^{lm}	۰/۳۰۴۳ ^g	۰/۵۷۰۹ ^{ij}
۲۰۰ میکرومولار	۰/۰۸۵۳ ^{fgh}	۰/۱۰۳۰ ^{jkl}	۰/۵۰۷۳ ^{fg}	۱/۰۳۱۷ ^{hi}
۴۰۰ میکرومولار	۰/۰۹۷۷ ^{fgh}	۰/۱۲۱۷ ^{ijk}	۰/۶۴۷۳ ^{fg}	۱/۴۰۷۹ ^{fgh}
۶۰۰ میکرومولار	۰/۱۰۲۰ ^{fgh}	۰/۱۶۷۰ ^b	۴/۱۶۹۳ ^{de}	۲/۱۷۳۲ ^{de}
۸۰۰ میکرومولار	۰/۱۲۵۰ ^{defgh}	۰/۳۳۴۷ ^b	۵/۷۱۰۳ ^b	۴/۶۰۰۵ ^b

حروف مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف غیرمعنی دار تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. داده‌ها، میانگین سه تکرار \pm SE است.

ادامه جدول ۳-

درصد میکوریزی	محتوای آسکوربات	محتوای گلوکوتائین	محتوای مالون دی آلدئید	تیمار منگنز
	mg/gFW	mg/gFW	μM/gFW	
-	۰/۲۴۷۰ ^{ab}	۰/۲۲۱۶ ^{cdef}	۰/۰۲۱۶ ^j	شاهد
-	۰/۲۲۴۸ ^{bcd}	۰/۲۰۰۶ ^{defg}	۰/۰۳۳۶ ^{hi}	۲۰۰ میکرومولار
-	۰/۱۰۶۹ ^{defgh}	۰/۰۹۷۰ ^{fg}	۰/۰۴۹۷ ^{efg}	۴۰۰ میکرومولار
-	۰/۰۷۳۷ ^{ghi}	۰/۰۷۸۳ ^{hg}	۰/۰۷۵۸ ^b	۶۰۰ میکرومولار
-	۰/۰۵۰۳ ⁱ	۰/۰۴۹۹ ^h	۰/۰۸۹۷ ^a	۸۰۰ میکرومولار

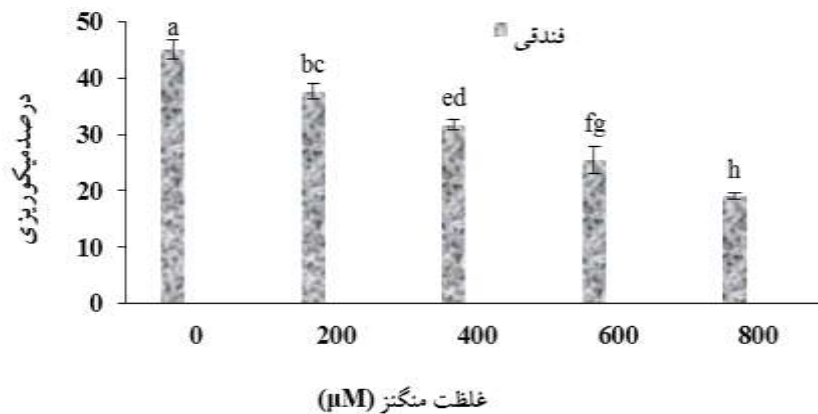
حروف مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف غیرمعنی دار تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. داده ها، میانگین سه تکرار ± SE است.



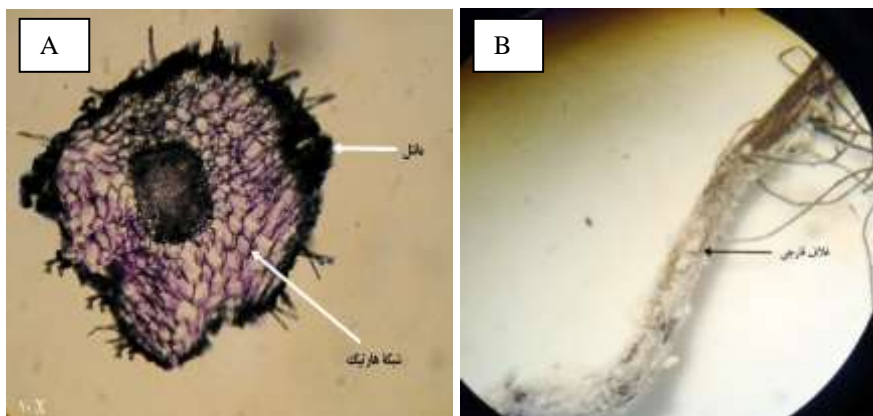
شکل ۴- A اثر سطوح مختلف فلز منگنز بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ پسته فندقی میکوریزی و غیرمیکوریزی. B اثر سطوح مختلف فلز منگنز بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ پسته فندقی میکوریزی و غیرمیکوریزی. داده ها میانگین سه تکرار ± SE است. براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون های مربوط به یک فاکتور نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) می باشند.

به گیاهان شاهد گزارش شد. در این دو غلظت در میزان فعالیت این آنزیم بین دو گروه گیاه میکوریزی و غیرمیکوریزی نیز تفاوت معنی داری مشاهده شد (شکل ۴B).

افزایش معنی دار در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در مورد گیاهان میکوریزی از غلظت ۴۰۰ میکرومولار و در مورد گیاهان غیرمیکوریزی از غلظت ۶۰۰ میکرومولار منگنز نسبت



شکل ۵- اثر سطوح مختلف فلز منگنز بر درصد آغشتگی ریشه رقم پسته فندقی میکوریزی (M). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE است. براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشند.



تصویر ۱- ریشه‌های اکتومیکوریزی شده پسته رقم فندقی در زیر میکروسکوپ تشریحی (A) و میکروسکوپ نوری (B)

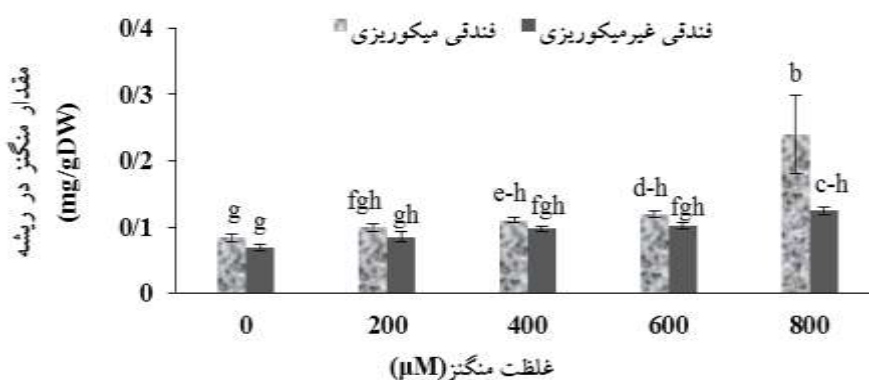
به طوری که بیشترین میزان انباشتگی در ریشه گیاهان میکوریزی، در غلظت ۸۰۰ میکرومولار منگنز بود که $186/454$ درصد افزایش را نسبت به گیاهان شاهد داشت (شکل ۶). افزایش معنی‌دار غلظت منگنز در بخش هوایی گیاهان غیرمیکوریزی از غلظت ۶۰۰ میکرومولار و در گیاهان میکوریزی در غلظت ۸۰۰ میکرومولار نسبت به گیاهان گروه شاهد مشاهده شد (شکل ۷ و تصویر ۲).

بحث

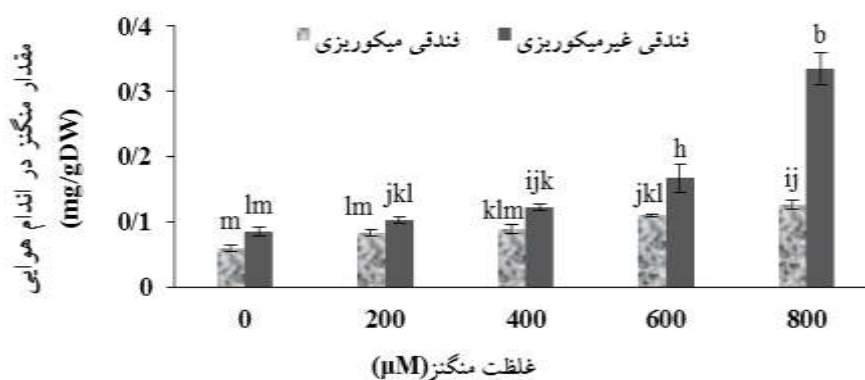
منگنز پنجمین عنصر در پوسته کره زمین از نظر فراوانی است و در طبیعت به صورت آزاد وجود ندارد. دسترسی منگنز برای گیاه به وسیله فرایندهای ردوکس که به pH و دسترسی الکترون بستگی دارد کنترل می‌شود در خاک‌های اسیدی، آتشفشانی و

نتایج درصد آغشتگی ریشه‌ها به اکتومیکوریز در غلظت‌های متفاوت فلز منگنز: با افزایش غلظت فلز منگنز در محلول غذایی کاهش معنی‌داری در درصد آغشتگی ریشه‌ها مشاهده شد. کمترین درصد آغشتگی ریشه‌ها در غلظت ۸۰۰ میکرومولار منگنز بود که $57/77$ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد و بیشترین میزان آغشتگی، در غلظت ۲۰۰ میکرومولار منگنز بود که فقط ۱۵ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد (شکل ۵ و تصویر ۱).

نتایج حاصل از اثر تیمار منگنز بر میزان تجمع فلز در ریشه و بخش هوایی در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی پسته: بر طبق دو نمودار ۶ و ۷، کاربرد منگنز در سطوح مختلف موجب انباشت این فلز در بخش‌های ریشه‌ای در مقایسه با بخش هوایی در گیاهان میکوریزی شده است



شکل ۶- محتوای منگنز ریشه در پسته فندقی میکوریزی و غیرمیکوریزی در تیمارهای مختلف منگنز. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE است. براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشند.



شکل ۷- محتوای منگنز اندام هوایی در پسته فندقی میکوریزی و غیرمیکوریزی در تیمارهای مختلف منگنز. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE است. براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشند.



تصویر ۲- گیاه پسته رقم فندقی میکوریزی و غیرمیکوریزی تحت تیمار با فلز منگنز

سمیت در بافت‌های گیاهی در حضور فلزات سنگین از قبیل منگنز تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد تنش اکسیداتیو است رادیکال‌های آزاد با اثر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب

غرقابی، افزایش احیای منگنز باعث تبدیل اشکال مختلف این عنصر به شکل فعال جذبی شده و منجر به مسمومیت می‌شود (حاجی‌بلند و خسروپناه، ۱۳۸۴). یکی از مکانیسم‌های بروز

آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی از طریق افزایش فعالیت چرخه آسکوربات-گلوتاتیون می‌شود که این سیستم‌ها، نقش مهمی را در حفاظت غشاهای بیولوژیکی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع فلزات سنگین ایفا می‌نمایند. کاهش تیول‌های پروتئینی و غیرپروتئینی، آسکوربات و گلوتاتیون در گیاهان تیمار شده با فلز منگنز در این تحقیق نشان‌دهنده این است که گیاه پسته دچار تنش اکسیداتیو شده است. افزایش میزان MDA در گیاه سبب تحریک سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی از طریق افزایش فعالیت چرخه آسکوربات-گلوتاتیون می‌شود که این سیستم‌ها، نقش مهمی را در حفاظت غشاهای بیولوژیکی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع فلزات سنگین ایفا می‌نمایند. احتمالاً به علت ورود گلوتاتیون احیا در مسیر سنتز فیتوکلاتین‌ها و در نتیجه کاهش گلوتاتیون احیا و یا به علت کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در چرخه اکسید و احیا آسکوربات، نسبت دهیدروآسکوربات به آسکوربات افزایش می‌یابد (Cho and Seo, 2005). احتمالاً کاهش در میزان آسکوربات در این تحقیق در غلظت‌های بالای منگنز نیز می‌تواند به این علت باشد. به طوری که در تیمار گیاهان با این فلز محتوای آسکوربیک اسید و گلوتاتیون احیا به ویژه در گیاهان غیرمیکوریزی کاهش یافت. افزایش محتوای آسکوربات و گلوتاتیون در گیاه میکوریزی *Lonicera japonica* در تیمار با فلز سنگین کادمیوم (Jiang et al., 2016)، در گیاه میکوریزی *Sorghum halepense* در تیمار با فلز سزیوم (Huanga et al., 2016)، در گیاه میکوریزی *Phaseolus vulgaris* در تیمار با فلز روی (Jiang et al., 2016) نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی گزارش شده است. افزایش محتوای آسکوربات و گلوتاتیون در گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریزی احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های MDHAR، APX، GR و DHAR در این گیاهان است.

سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی با سازوکار آنزیمی (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و ...) نیز از جمله مکانیسم‌هایی است که می‌تواند رادیکال‌های آزاد اکسیژن را از بین برده و خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو را تخفیف دهد. سوپراکسید دیسموتاز

غیراشباع واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون را تحریک کرده، و به تخریب اسیدهای چرب و تولید مالون دی‌آلدئید منجر می‌شوند (Taeck Jong et al., 2011). تنش منگنز و مقایسه آن با نمونه‌های شاهد نشان داد افزایش غلظت منگنز در محیط سبب القای تولید MDA می‌شود که این افزایش در گیاهان غیرمیکوریزی بیشتر و در بالاترین غلظت تیمار با فلز منگنز تفاوت معنی‌داری از لحاظ محتوای این پارامتر بین دو گروه گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی مشاهده شد. این ترکیب به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی برای تعیین آسیب‌های غشای شناخته شده است. افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید در پاسخ به تنش روی، مس و کادمیوم در گیاه میکوریزی لوبیا قرمز و گندم (Rabie, 2005) و در پاسخ به تیمار روی و مس در گیاه میکوریزی قهوه عربی (Andrade et al., 2010)، در پاسخ به تنش کادمیوم در گیاه میکوریزی گوجه (Hashem and Egamberdieva, 2016) نیز گزارش شده است.

ایجاد ارتباط میکوریزی بین قارچ *Agaricus bisporus* و گیاه پسته سبب کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش تولید MDA در گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریزی شد که این نتایج با گزارشات بسیاری از محققین مطابقت دارد (Andrade et al., 2010; Hashem and Egamberdieva, 2005; Rabie, 2016). یکی از مکانیسم‌های بروز سمیت در بافت‌های گیاهی در حضور فلزات سنگین تشویق تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد تنش اکسیداتیو است. در حالت طبیعی بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و میزان نابودی آنها از سطح سلولی گیاه تعادلی وجود دارد اما اگر این تعادل به هم بخورد و میزان رادیکال‌های آزاد موجود در سلول از مقدار ترکیبات سم‌زدا و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه تجاوز کند تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد (Hashem and Egamberdieva, 2016). گیاهان مکانیسم‌های دفاعی متعددی برای کنترل و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیژن به کار می‌گیرند. از جمله این مکانیسم‌ها سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی با سازوکار آنزیمی و غیرآنزیمی است.

افزایش میزان MDA در گیاه سبب تحریک سیستم‌های

اکثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (SOD، CAT و APX) را در گیاه پسته و به‌ویژه در گیاهان میکوریزی افزایش داده است، با این وجود به‌نظر می‌رسد که این افزایش برای جبران افزایش H_2O_2 و تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در اثر سمیت منگنز کافی نبوده و میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان بیشتر بوده است. بنابراین در گیاهان در معرض منگنز به‌خصوص در غلظت بالای آن، تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به غشا را موجب شده است.

(SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) نیز آنزیم‌های مهم پاداکسیدایشی هستند که گونه‌های فعال اکسیژن را جاروب می‌کنند و از اکسیداسیون لیپیدها، تخریب کلروفیل و آسیب‌های دیواره سلولی جلوگیری می‌کنند (Rabie, 2005). در مطالعه حاضر مشخص شد که میزان فعالیت این دو آنزیم تحت تأثیر فلزات سنگین منگنز افزایش یافته است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقایسه با نمونه‌های شاهد معنی‌دار است. که این افزایش در گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریزی محسوس‌تر بود. علیرغم اینکه تیمار با غلظت‌های بالای منگنز در این مطالعه فعالیت

منابع

- بهرامی سیرمندی، س.، احمدی مقدم، ع. و حسینی فرد، ج. (۱۳۸۹) اثر اکتومیکوریز بر روی میزان برخی عناصر معدنی موجود در گیاه پسته احمد آقایی تحت تیمارهای مختلف منیزیم. مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران ۱-۱۲.
- پناهی، ب.، اسماعیل‌پور، ع.، فربود، ف.، مؤذن‌پور کرمانی، م. و فریور، م. (۱۳۸۷) راهنمای پسته (کاشت، داشت و برداشت). چاپ دوم، نشر آموزش کشاورزی (وزارت جهاد کشاورزی).
- خسروپناه، م. و حاجی‌بلند، ر. (۱۳۸۴) تحمل مسمومیت منگنز در گیاهان آفتابگردان، برنج و ذرت در شرایط آب‌کشتی.
- صالحی، ف.، مرادی قهدریجانی، م.، میرابوالفتحی، م. و علی اصغرزاده، ن. (۱۳۸۷) تأثیر کلونیزاسیون قارچ‌های میکوریزی وزیکولار آربوسکولار و سطوح مختلف فسفر بر جذب فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم و صفات رویشی نهال پسته. مجله زراعت و باغبانی ۷۸: ۵۶-۴۸.
- فلاحیان، ف.، عباسپور، ح. و فهیمی، ح. (۱۳۸۴) بررسی تأثیر قارچ اندومیکوریز بر تغذیه معدنی و رشد گیاه پسته در شوری. مجله پژوهش و سازندگی ۶۷: ۸۶-۸۲.
- محبوب‌القلوب، ا. (۱۳۹۰) مطالعه تأثیر اکتومیکوریز بین پسته احمد آقایی و قارچ دکمه‌ای بر جذب مقادیر مختلف کادمیم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.
- نادرنژاد، ن. (۱۳۹۲) بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز و تولید ترکیبات فنلی در گیاه پسته و اثر اکتومیکوریز در کاهش تنش اکسیداتیو UV-B. پایان‌نامه دکتری، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.
- هاشمی، ش. و اسرار، ز. (۱۳۸۹) اثر منگنز بر رشد و برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در شاهی (*Lepidium sativum* L.). مجله زیست‌شناسی گیاهی ۵: ۱-۱۲.
- Andrade, S. A. L., Silveira, A. P. D. and Mazzafera, P. (2010) Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea arabica* seedlings to increasing Zn and Cu concentrations in soil. *Science of the Total Environment* 408: 5381-5391.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cho, U. and Seo, N. (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168: 113-120.
- Dalvi, A. and Satish, A. (2013) Response of plants towards heavy metal toxicity: An overview of avoidance, tolerance and uptake mechanism. *Annals of Plant Sciences* 362-368.

- De Pinto, M., Francis, D. and De Gara, L. (1999) The redox state of the ascorbate dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY 2 cells. *Protoplasma* 209: 90-97.
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77.
- Fernandez-Fuego, D., Keunen, E. and Cuypers, A. (2017) Mycorrhization protects *Betula pubescens* Ehr. From metal-induced oxidative stress increasing its tolerance to grow in an industrial polluted soil. *Journal of Hazardous Materials* 336: 119-127.
- Gellier, B., Letouze, R. and Steullu, D. G. (1984) Micro propagation of Brich and mycorrhizal formation in vitro. *New Phytologists* 97: 591-599.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Cho, U. H. and Seo, N. H. (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168: 113-120.
- Hashem, A. and Egamberdieva, D. (2016) Alleviation of cadmium stress in *Solanum lycopersicum* L. by arbuscular mycorrhizal fungi via induction of acquired systemic tolerance. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 272-281.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-190.
- Huanga, R., Lub, Y., Yanga, H., Huanga, W. and Chen, K. (2016) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on caesium accumulation and the ascorbate-glutathione cycle of *Sorghum halepense*. *Asian Journal Plant Science* 42: 323-331.
- Jiang, Q., Feng, Zh., Shi-Hui, L., Hai-Di, Zh., Dan-Jing, Y., Zhi-Hong, Y., Shao-Shan, L. and Yuan-Xiao, J. (2016) Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils? *Scientific Reports* 6: 1-9.
- Kafkas, S. and Ortas, I. (2009) Various mycorrhizal fungi enhance dry weights, P and Zn uptake of four *Pistacia* Species. *Journal of Plant Nutrition* 32: 146-159.
- Laiye, Q. U., Quoreshi, A. M., Iwase, K., Tamai, Y., Funada, R. and Koike, T. (2003) In vitro ectomycorrhizal formation on two larch species of seedlings with six different fungal species. *Eurasian Research Journal* 6: 65-73.
- Lozak, A. and Soltyk, K. (2002) Determination of selected trace elements in herbs and their influence. *Science Environment* 289: 33-40.
- Marx, D. H. (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Mohammadi, K. and Khalesro, SH. (2010) Beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* 1: 310-319.
- Nakano, V. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Rabie, G. H. (2005) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African Journal of Biotechnology* 4: 332-345.
- Schramm, W. (2019) World pistachio trade. 1st Ed. Associates, Inc. Printed in the United States of America.
- Taeck Jong, L., Binod Prasad, L. and Won Hee, K. (2011) Growth and physiological response to manganese toxicity in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. campestris). *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 52: 252.
- Turjaman, M., Tamai, Y., Segah, H., Youngcha, J., Hesterlimin, S., Osaki, M. and Tawaraya, K. (2005) Inoculation with the ectomycorrhiza fungi *Pisolithus arhizus* and *Scleroderma* sp. improves early growth of *Shorea pinanga* nursery seedling. *New Forests* 30: 67-73.

Role of mycorrhizal fungi in the alleviation of Manganese toxicity in Fandoghi cultivar of pistachio (*Pistacia vera L.*) trees

Fereshteh mohamadhasani^{1*}, Ali Ahmadimoghadam²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Payamenoor University of Tehran, Iran

² Department of Biology, Faculty of Science, Bahonar University, Kerman, Iran

(Received: 18/07/2020, Accepted: 21/12/2020)

Abstract

In metal contaminated soils, ectomycorrhizal (ECM) fungi may improve plant growth through an enhanced nutrition or by alleviating toxicity of the metals. In order to evaluate the alleviating effects of ectomycorrhizal colonization on Mn toxicity, a study was performed using pistachio plants and *Agaricus bisporus* fungus as factorial in a completely randomized design with three replications. The experiment included two factors: mycorrhizal (M) and non-mycorrhizal (NM) pistachio plants and five levels of the Mn concentrations (0, 200, 400, 600 and 800 μm) in 3 replicates. In this study, the experiment was conducted to investigate the effect of ectomycorrhizal colonization in the alleviation of oxidative stress and improvements of the antioxidant enzyme activities, as well as lipid peroxidation and metal accumulation in pistachio trees (Fandoghi cultivar). The results showed that the increase of Manganese concentration caused an increase in the malondialdehyde (MDA), and induction in antioxidative enzymes activity in the leaves of the M and NM plants, but it was dramatically higher in M plants. A decrease of ascorbate (ASA) content was induced by increasing the zinc concentration where it was higher in M plants but all metal treatments increased dehydroascorbate (DHA) contents in both M and NM plants. The results showed that the Mn translocated from root to shoot in M plants was lower than the NM plants. The amelioration of Mn toxicity by *A.bisporus* may be a result of improving the antioxidant defense system and prevention of the absorption of heavy metals.

Key words: Antioxidant enzymes, Manganese, lipid peroxidation, Ectomycorrhiza, *Agaricus bisporus*